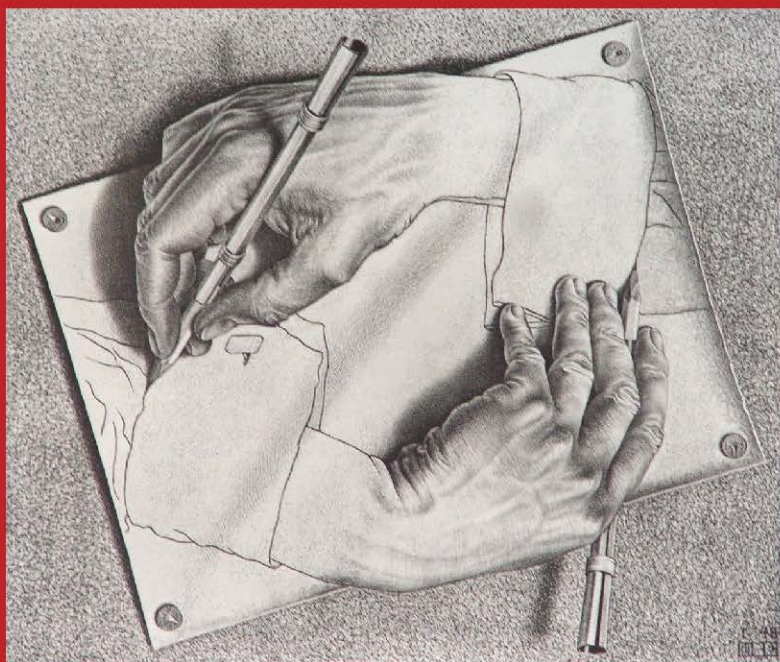


CONCORDIA REGIONUM I.

# Interdiszciplinaritás a Kárpát-medencében I.

Külhoni magyar  
doktorandusz hallgatók  
konferencia-előadásaiából



ELTE Márton Áron Szakkollégium

Budapest • 2019

# Interdiszciplinaritás a Kárpát-medencében

Külhoni magyar doktorandusz  
hallgatók konferencia-előadásaiból

Debrecen, 2018. április 6.



ELTE Márton Áron Szakkollégium

Szerkesztette  
Boda Attila

ELTE Márton Áron Szakkollégium  
Budapest · 2019



## CONCORDIA REGIONUM

### KÜLHONI FIATAL MAGYAR KUTATÓK TANULMÁNYAI AZ ELTE MÁRTON ÁRON SZAKKOLLÉGIUM PUBLIKÁCIÓS FÓRUMA

Sorozatszerkesztő: Mészáros Tamás

I. kötet

*Interdiszciplinaritás a Kárpát-medencében. Külhoni magyar  
doktorandusz hallgatók konferencia-előadásaiból.  
Debrecen, 2018. április 6.*

© ELTE Márton Áron Szakkollégium és a szerzők, 2019

A kötet borítója Maurits Cornelius Escher *Rajzoló kezek*  
című képének felhasználásával készült.

Felelős kiadó

Dr. Mészáros Tamás, az ELTE Márton Áron Szakkollégium szakmai igazgatója  
ELTE Márton Áron Szakkollégium, H-1037 Budapest, Kunigunda útja 35.

ISBN 978-963-489-081-2

HU ISSN 2631-1208

Nyomdai előkészítés

Sára Balázs

Nyomdai munkálatok

CC Printing Szolgáltató Kft.

1118 Budapest, Rétköz u. 55/A, fsz. 4.

Törvényes képviselő: Szendy Ilona

Gajdács Mórió

## Humán gyógyászatban alkalmazott gyógyszervegyületek quorum sensing (QS)-gátló hatásának vizsgálata

### Bevezetés

A fertőző megbetegedések még napjainkban is az egyik legjelentősebb kóroki tényezőnek számítanak. Habár az epidemiológiai jellemzők szempontjából különböznek ugyan, a fejlődő országok (pl. hasmenéssel járó fertőzések, közösségben szerzett pneumónia, AIDS, gümőkór, malária) és a nyugati társadalmak (nozokomiális fertőzések, *Clostridioides difficile* colitis, immunszuprimált betegek opportunistá infkciói) egyaránt érintettek, ezek a kórképek sokmillió ember életminőségének romlásáért és haláláért felelősek.<sup>1</sup> Az antibiotikumok a modern orvoslás nélkülözhetetlen elemei, sem az akut bakteriális infkciók kezelése, sem pedig a legkülönbébb orvosi beavatkozások (sebészeti beavatkozások, szervátültetés, rákos betegek citosztatikus terápiája, koraszülöttek ellátása) nem valósulhatnának meg nélkülük.<sup>2</sup> Az antibiotikumok hatékonysága azonban hanyatlóban van, mind az egyre terjedő és gyorsan kialakuló rezisztencia miatt, mind a nem megfelelő felhasználásuk miatt, emellett a klinikai kutatási nehézségek és az ökonómiai tényezők is gátat szabnak az új szerek fejlesztésének.<sup>3</sup> A klinikai szempontból legfontosabb rezisztens kórokozókat az ún. ESKAPE-patogének csoportja foglalja össze.<sup>4</sup> Ide sorolható a vancomycin-rezisztens *Enterococcus faecium* (VRE), a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), a multidrog rezisztens *Acinetobacter baumannii* (MACI), a multidrog rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* és *Kleb-*

---

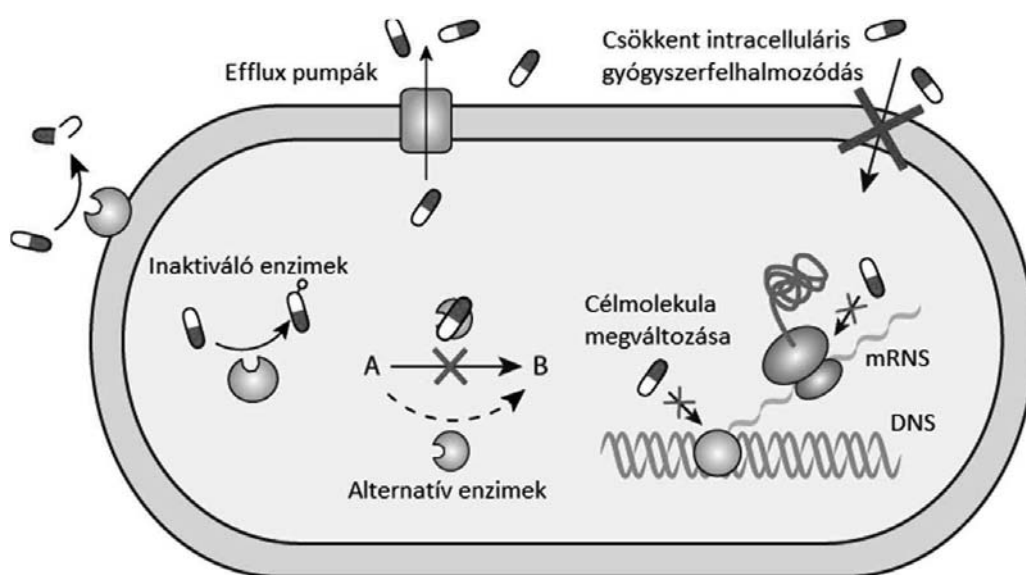
1 WORLD ECONOMIC FORUM 2013.

2 WHO 2014.

3 ECDC 2014; SILVER 2011; SZABÓ et al. 2016.

4 BOUCHER et al. 2009.

*siella* sp. (vagy *C. difficile*), valamint az *Enterobacter* sp. (vagy Enterobacteriaceae csoport). Súlyos problémát jelentenek továbbá a multidrog rezisztens *Neisseria gonorrhoeae* és a szélesített spektrumú béta-laktamáz termelő (ESBL+) *Enterobacteriaceae* család tagjai is, az utóbbiak a rezisztencia gyors, plazmidokon történő terjedése miatt.<sup>5</sup> Becslések szerint Európában 25 000 ember hal meg évente MDR baktérium által okozott fertőzésben, ez a teljes népességre vetítve 700 000 embert jelent, míg ezt az értéket 2050-re 10 millió körülire becsülik.<sup>6</sup> A bakteriális rezisztencia súlyossága szempontjából három kategóriát különböztethetünk meg: multidrog rezisztens (MDR) az a baktérium törzs, mely rezisztenciát mutat legalább egy antibiotikumra legalább három antibiotikum osztályból; kiterjedt rezisztenciával rendelkezik (extensively drug-resistant, XDR) az a törzs, amely kettő vagy kevesebb antibiotikummal szemben mutat érzékenységet minden antibiotikum osztályból és pándrog rezisztens (pandrug-resistant, PDR) kórokozók azok, amelyek nem mutatnak érzékenységet egyik antibiotikummal szemben sem.<sup>7</sup> A baktériumok számos molekuláris mechanizmuson keresztül képesek rezisztens fenotípust kialakítani, ezen mechanizmusokat az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra: Főbb bakteriális rezisztencia mechanizmusok

5 WHO 2017

6 ECDC 2014.

7 MAGIORAKOS et al. 2012.

A rezisztens kórokozók elleni harcban az leghatékonyabb eszközünk az új hatásmechanizmusú antibiotikumok fejlesztése lenne, azonban a kutatás üteme nem tud lépést tartani a rezisztencia viszonyok alakulásával; ez részben betudható az antimikrobiális szerek klinikai kutatásához kapcsolódó költségeknek és nehézségeknek, másrészt a gyógyszeripar anergiájának is.<sup>8</sup> Emiatt a kutatásban számos alternatív stratégia látott napvilágot a mikroorganizmusok elleni harcban. Az egyik ilyen stratégia a kombinációs terápia, azonban a klinikai gyakorlatban a kombinációs terápia alkalmazása (egyes jól definiált klinikai szituációt leszámítva) továbbra is megosztó és kevés bizonyítékkal rendelkező kockázat (rezisztencia további kialakulása) és a haszon (megnövekedett túlélés) arányát illetően.<sup>9</sup>

Egy másik lehetséges stratégia lehet különböző adjuvánsok alkalmazása az antibakteriális terápiában. Ezek az adjuvánsok lehetnek multidrog rezisztencia visszafordító vegyületek (pl. efflux pumpa gátlók), melyekkel elméletben ismét hatékonyá tehetők olyan régi antibiotikumok is, melyek már kiszorultak a klinikai gyakorlatból az ellenük kialakult kiterjedt rezisztencia miatt.<sup>10</sup> Az adjuvánsok egy további csoportját az ún. virulencia gátló vegyületek képezik. Ezen molekulák nem a baktérium elpusztításán keresztül fejtik ki hatásukat, hanem a patogenezisben fontos különböző virulencia faktorok (pl. toxinok) kifejeződését gátolják. Előnyük, hogy ebben az esetben sokkal kisebb szelekciós nyomás nehezedik a baktériumokra, így az ilyen vegyületek ellen kialakult rezisztencia is várhatóan alacsony szintű lesz.<sup>11</sup>

A baktériumok képesek diffúzibilis szignálmolekulákkal (autoinducerekkel) kapcsolatot létesíteni a környező baktériumsejtekkel, ezt a sejt-sejt kommunikációt quorum sensing-nek (QS) nevezzük.<sup>12</sup> A QS széles körben elterjedt mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok körében. Számos QS rendszer (pl. *Vibrio fischeri* LuxI/LuxR rendszere, *P. aeruginosa* LasI/LasR rendszere, *Agrobacterium tumefaciens* TraI/TraR rendszere) és szignálmolekula (pl. acil-homoszerin laktonok /AHL/ Gram-negatív baktériumokban, autoinducer peptidek /AIP/ Gram-pozitív baktériumokban) létezik, de mindegyik rendszer ugyanazon alapokon nyugszik.<sup>13</sup> Minden baktérium szintetizálja ezeket a szignál molekulákat alacsony koncentrációban. Ha a po-

8 GARLAND et al. 2017.

9 BUSH 2017.

10 GONZÁLEZ-BELLO 2017; SPENGLER et al 2017.

11 WRIGHT 2016.

12 MILLER – BASSLER 2001.

13 RUTHERFORD – BASSLER 2012.

puláció-denzitás eléri a küszöb koncentrációt, pozitív visszacsatolás (feedback) következik be és a baktériumok növelik a szignál molekulák termelését. Miután ez bekövetkezett, a sejtpopuláció denzitásának függvényében megváltozik különböző bakteriális gének expressziója, amelyek fenotípusos változásokat idéznek elő.<sup>14</sup> Ezen génexpressziós változások a bakteriális fiziológia és a virulencia számos területét érinthetik: biofilm termelés (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), virulencia faktorok expressziója (toxikus shock syndroma toxin–*S. aureus*, 3-as típusú szekréciós rendszer /T3SS/-*Salmonella* spp., kompetencia (*Streptococcus pneumoniae*), fluoreszcencia (*V. fischeri*), efflux pumpák kifejeződése (*P. aeruginosa*), pigment képződése (*Serratia marcescens*, *Chromobacterium* spp.). A QS-gátlására (ún. quorum quenching) alkalmas vegyületek potenciális terápiás alternatívát jelentenek a humán gyógyászatban, azonban klinikai vizsgálatban még egy ilyen vegyület sem szerepelt.<sup>15</sup>

A quorum sensing-gátlás vizsgálatára számos *in vitro* bakteriális modellrendszer (különböző indikátor törzsek alkalmazása, melyek színváltozással vagy más növekedési sajátosságukkal utalnak a jelzőmolekulák jelenlétére), molekuláris biológiai technika és *in vivo* állatmodell áll a rendelkezésünkre, de a leggyakrabban használt kísérleti protokollnak a papírkorong diffúziós technikát tekinthetjük.<sup>16</sup> Ezen módszerek előnye, hogy a többi módszerhez képest olcsó, így a kevés forrással rendelkező laboratóriumok számára is elérhető, azonban rossz reprodukálhatóság és számos, egymásnak ellentmondó kísérleti protokoll található a szakirodalomban, ami megnehezíti az eredmények értékelését és összehasonlítását.<sup>17</sup>

Számos szakirodalmi adat áll rendelkezésre különböző gyógyszer-molekulák QS-gátló hatását illetően. Döntően antibiotikumok (pl. azitromycin) sejt-kommunikációra gyakorolt hatását vizsgálták, bár néhány esetben más hatástani csoportba tartozó szert is bevontak a vizsgálatokba (pl. acetyl-salicilsav, mint a *P. aeruginosa* QS-gátlószere), azonban egy átfogó, több hatástani csoportot magába foglaló QS-gátló anyagok irányába történő szűrés még nem történt.<sup>18</sup> A kutatás célja a QS-gátlás vizsgálatára alkalmas korongdiffúziós módszer ideális kísérleti körülményeinek meghatározása (inkubáció ideje, hőmérséklet, felhasznált táptalaj), illetve a humán gyógyászatban alkalmazott vegyületek QS-gátló hatásának elemzése *in vitro*.

---

14 MILLER – BASSLER 2001.

15 DEFORDT 2018.

16 CHRISTENSEN et al. 2011; JAKOBSEN et al. 2011; SZABÓ et al. 2010.

17 VARGA et al. 2011.

18 EL-MOWAFY et al. 2014.

## Anyag és módszer

### Vizsgált vegyületek

Harminc, különböző hatástani csoportokba tartozó gyógyszervegyületet vizsgáltuk QS-gátló hatásuk irányában: *a*) nyákoldók: ambroxol (Teva), acetil-cisztein (Sandoz); *b*) nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID): acetil-szalicilsav (Bayer), indometacin (Sanofi), metamizol-nátrium (Sanofi), diklofenák-epolamin (IBSA); *c*) neuroleptikumok: prometazin (Sigma), klórpromazin (Sigma), tioridazin (Sigma); *d*) antivirális szerek: aciklovir (Teva), cidofovir (Gilead); *e*) nukleozid-analóg daganatellenes szerek: methotrexát (Ebewe), 5-fluorouracil (Teva), gemcitabin (Kabi); *f*) mikrotubulus-rendszerre ható daganatellenes szerek: vinkrisztin (Kyowa), paklitaxel (Teva); *g*) topoizomeráz-enzimre ható daganatellenes szerek: doxorubicin (Teva), topotekán (Actavis), bleomycin (Teva); *h*) alkiláló ágensek: ciklofoszfamid (Baxter), ciszplatin (Teva); *i*) vitaminok és antioxidáns hatású vegyületek: B<sub>1</sub>-vitamin (Zentiva), B<sub>6</sub>-vitamin (Egis), B<sub>12</sub>-vitamin (Richter), C-vitamin (Sigma), D-vitamin (Fresenius), E-vitamin (Sigma), Q<sub>10</sub>-koenzim (Sigma); *j*) egyéb vegyületek: azelasztin (H<sub>1</sub>-receptor blokkoló; Meda-Pharma), verapamil (Ca<sup>2+</sup>-csatorna blokkoló; Teva).

Referencia anyagokként az alábbi vegyületeke használtuk: 70%-os etil-alkohol (Sigma), 85%-os glicerín (Sigma), foszfát sóoldat puffer (PBS; Sigma), dimetil-szulfoxid (DMSO; Sigma), 5%-os FeEDTA törzsoldat, mikroelemeket tartalmazó törzsoldat, 3%-os CaCl<sub>2</sub> törzsoldat, akridin narancs (25,0 mg/ml; Sigma).

### Táptalajok, táptalaj-komponensek

- Luria-Bertani (LB) folyékony tápleves és táptalaj (Bio-Rad)
- Módosított Luria-Bertani (LB) folyékony tápleves és táptalaj (1 literre vonatkoztatva: 8,0 g tripton, 5,0 g élesztőkivonat, 2,0 g glükóz, 5,0 g NaCl, 1,0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 10,0 ml kalcium-klorid-törzsoldat, 5,0 ml FeEDTA-törzsoldat, 1,0 ml mikroelem-törzsoldat, illetve szilárd táptalaj esetén 12,0 g bakteriológiai agar)
- Nutrient folyékony tápleves (NB) és szilárd táptalaj (NA) (Bio-Rad)
- Müller-Hinton (MH) tápleves és táptalaj (Bio-Rad)



A táptalaj-optimalizálási kísérletek során továbbá az alábbi anyagokat használtuk: 3%-os kalcium-klorid-törzsoldat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  felhasználásával), 5%-os FeEDTA törzsoldat ( $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  és  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  felhasználásával), mikroelem-törzsoldat (100 ml-re vonatkoztatva: 1,0 g  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 25 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ). A törzsoldatokat 50 ml-ként alikvotoltuk és  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

### Baktérium törzsek

*Chromobacterium violaceum* wt85 (Gram-negatív pálca, vad típusú, QS-szignál molekulák által szabályozott lila színű violacein pigment termelő törzs), *C. violaceum* CV026 (Gram-negatív pálca, Tn5-mutáns, AHL-indikátor törzs, amely nem képes endogén AHL termelésére, de képes a környezeti QS-szignálok érzékelésére), *Sphingomonas* Ezf 10-17 (Gram-negatív pálca; „Ezertűfű” szőlő [*Vitis vinifera*] tumorból izolálva, AHL-termelő törzs), *Enterobacter cloacae* klinikai izolátum azonosító: 31298 (Gram-negatív pálca; sebváladékból izolálva, AHL-termelő törzs), *Serratia marcescens* AS-1 (Gram-negatív pálca; vad típusú, QS-szignál molekulák által szabályozott narancssárga színű prodigiosin pigment termelő törzs), *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Gram-negatív pálca; cseresznyefa [*Prunus avium*] tumorból izolálva, AHL-indikátor törzs), *A. tumefaciens* C58 (Gram-negatív pálca; AHL-termelő törzs, pozitív kontrolltörzs *A. tumefaciens* NTL4-hez).

A vizsgált baktérium törzseket Dr. Szegedi Ernő bocsátotta rendelkezésünkre (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet). A baktérium törzsek fenntartása rövidebb időszakokra (<1 hónap) szilárd LB és LB\* agar táptalajokon történt, fagyasztásukat 85%-os glicerinnel és LB tápleves 1:4 arányú elegyében végeztük és  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk őket.

### QS-törzsek növekedési tulajdonságainak meghatározása

Az ideális kísérleti körülmények azonosítása érdekében az alkalmazott baktérium törzsek növekedési sajátosságai meghatározásra kerültek Nutrient broth (NB), Müller-Hinton (MH) és Luria-Bertani (LB) táplevesben, illetve Nutrient agar (NA), Müller-Hinton (MH) és Luria-Bertani szilárd (LB) ptalajon. A vizsgálatok során a folyékony és szilárd táptalajokat kalibrált kaccsal azonos primer tenyészetből inokuláltuk minden baktérium esetén. Megfigyelésre került a minta optikai denzitása ( $\text{OD}_{580}$ ) és a telepek száma, emellett a pigment-termelés mértéke is. A növekedési tulajdonságokat négy különböző hőmér-

sékleten (0 °C/ 10 °C/ 25 °C/ 37°C) figyeltük meg, a leolvasásokat 12, 24, 48 és 72 óra inkubálás után végeztük. A vizsgálatok eredménye három párhuzamos kísérlet átlagából származik. Szakirodalmi adatokra alapozva, a vizsgálatunkat később kiegészítettük egy módosított Luria-Bertani (LB\*) táptalajjal is, ezen eredményeket a klasszikus LB-táptalajjal vetettük össze (lásd *Táptalajok, táptalaj-komponensek*).

### **Gyógyszervegyületek legkisebb gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása**

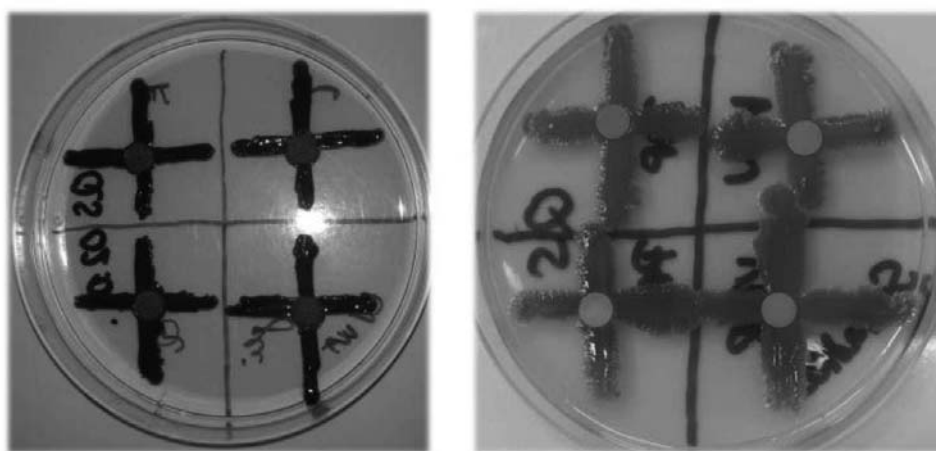
A MIC vagy legkisebb gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration) az antibiotikumok vagy vizsgált kísérleti anyagok azon legkisebb koncentrációja (µg/ml vagy mg/l), amely a baktériumok növekedését gátolni képes. Kísérleteink során a vizsgált gyógyszervegyületek antibakteriális hatását felező hígítási módszerrel, 96-lyukú mikrotitráló lemezben vizsgáltuk a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) előírásai alapján. A vegyületekből kettes léptékű hígítási sort készítettünk 100 µl Müller-Hinton (MH) táplevesben. A kezdő koncentrációk a vizsgálatok során a gyógyszervegyületek törzsoldatainak koncentrációjától függően 0,5-50 mg/ml között mozogtak. A baktériumsejteket 100 µl táplevesben adtuk a lyukakhoz, a médium kontroll sor kivételével. A lemezeket 37 °C fokon, termosztátban inkubáltuk 16-18 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után a vizsgált vegyületek MIC értékét szabad szemmel olvastuk le. A vizsgálatok eredménye három párhuzamos kísérlet átlagából származik.

A vizsgálat célja a vizsgált vegyületek esetleges antibakteriális hatásának szűrése, hogy a későbbi, QS-gátlási vizsgálatokban különbséget tudjunk tenni a valós bakteriális sejtkommunikáció-gátló hatás és a baktérium populáció denzitását csökkentő (bakteriosztatikus vagy baktericid) hatásuk között.

### **Szűrés QS-gátló hatás irányába kereszt-kioltásos módszerrel**

A gyógyszervegyületek és a referencia anyagok QS-gátló hatás irányába történő szűrése kereszt-kioltásos módszerrel történt, *C. violaceum* wt85 és *S. marcescens* AS-1 baktérium törzsek felhasználásával (2. ábra). A vizsgálat során folyékony LB\* táplevesben szaporított, OD<sub>580</sub>=0,5-ös overnight baktérium tenyészetet oltottunk ki kereszt alakban LB\* agar felszínére. A vizsgált vegyületek törzsoldatait papírkorongok (Whatmann 7M) segítségével vittük fel a táptalaj felszínére; a papírkorongokat a két kioltási sáv keresztezésénél helyez-

tük el, melyre 10 µl-t pipettáztunk a vegyületek törzsoldataiból (0,5–50 mg/ml). QS-gátló hatásra pozitívnak értékeltük azokat a vegyületeket, amelyeknél 48 órás inkubációs idő után szemmel láthatóan gátlódott a pigmentképződés (violacein vagy prodigiosin) a korong környezetében, legalább az egyik vizsgált baktérium törzs esetén. Pozitív kontrollként akridin narancsot használtunk, negatív kontrollként DMSO-t és PBS-t, emellett a LB\* táptalajt tartalmazó törzsoldatokat is bevontuk a vizsgálatba. Minden vizsgált vegyület esetén három párhuzamos kísérletet végeztünk.

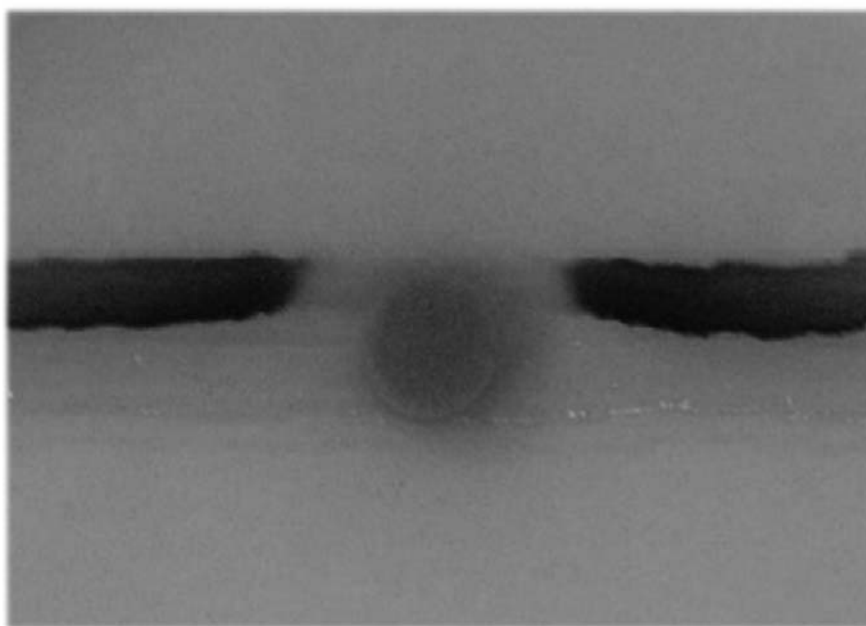


2. ábra: Szűrés QS-gátló hatás irányába kereszt-kioltásos módszerrel  
bal oldalon *C. violaceum* wt85, jobb oldalon *S. marcescens* AS-1

### QS-gátlás vizsgálata korongdiffúziós (párhuzamos kioltásos) módszerrel

Az előző vizsgálatban hatékonynak bizonyult vegyületek QS-gátló hatásának kvantitatív elemzésére *C. violaceum* CV026, *E. cloacae* klin. izol. azonosító: 31298 és *S. marcescens* AS-1 törzseket használtunk. A vizsgálat során folyékony LB\* táplevesben szaporított, OD<sub>580</sub>=0,5-ös overnight baktérium tenyészeteket oltottunk ki egyenes vonalban LB\* agar felszínére; a *S. marcescens* esetén egymagában (önmagában képes a prodigiosin termelésre), a *C. violaceum* CV026 (AHL-indikátor, külső QS-szignál hatására termel violaceint) mellé pedig *E. cloacae* (AHL-termelő) került párhuzamosan kiolva, egymástól kb. 5 mm-re (3. ábra). A vizsgált vegyületek törzsoldataiból kettes léptékű felezőhígításokat készítettünk, majd ezeket papírkorongok (Whatmann 7M) segítségével vittük fel a táptalaj felszínére; a papírkorongokat a kioltási sáv közepén helyeztünk

el, melyre 10 µl-t pipettáztunk a vegyületek oldataiból. A QS-gátló hatás számszerűsítésére vonalzó segítségével lemértük a QS-gátlási zónák (azaz az elszíntelenedett, de intakt baktérium tenyészet) átmérőjét a korongok körül. Pozitív kontrollként akridin narancsot használtunk, negatív kontrollként DMSO-t és PBS-t, emellett a LB\* táptalajt tartalmazó törzsoldatokat is bevontuk a vizsgálatba. A vizsgálatok eredménye három párhuzamos kísérlet átlagából származik.



3. ábra: QS-gátlás vizsgálata párhuzamos kioltásos módszerrel  
*C. violaceum* CV026/*E. cloacae*; Korong: akridin narancs

## Eredmények és megvitatásuk

### QS-törzsek növekedési tulajdonságainak meghatározása

A kísérletek során nem volt szignifikáns eltérés a baktérium törzsek növekedésében a különböző folyékony (NB, MH, LB) táplevesek között. A baktérium törzsek növekedése gátlódott alacsony hőmérsékleten (0 és 10 °C), a *C. violaceum* wt85 és CV026 törzseket leszámítva nem volt különbség a baktériumok szaporodásában 25 °C és a 37 °C-on történő inkubáció között, azonban meg-

figyeltük, hogy 37 °C-on a *S. marcescens* törzs már nem termelt prodigiosin pigmentet. Az LB és az LB\* táptalajok (2 g/l glükózzal és mikroelemeket tartalmazó törzsoldatokkal kiegészített) összehasonlítása esetén nem volt jelentős különbség baktériumok növededésében a folyékony táplevesek között, azonban a szilárd táptalajok esetén egyértelműen látható volt, hogy az LB\* táptalajon több telep képződött azonos inokulum felhasználásával, a baktériumok gyorsabban szaporodtak, illetve a pigment képződés is korábban következett be (1. táblázat).

Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a baktérium telepek növekedése és a pigmenttermelés az LB\* agaron 48 óra után volt tekinthető állandónak, 25 °C-on történő inkubáció esetén, így az összehasonlíthatóság és reprodukálhatóság érdekében a további vizsgálatok során ezeket a kísérleti paramétereket használtuk. A telepek növekedése és a pigmenttermelés intenzitása relatív függetlenséget mutatott a kiindulási inokulum optikai denzitásától  $OD_{580}=0,1-0,8$  tartományban, 48 órás leolvasási idő esetén (1. táblázat).

### Gyógyszervegyületek legkisebb gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása

A vizsgált gyógyszervegyületek döntő többsége nem rendelkezett antibakteriális hatással a kísérletek során használt baktérium törzsek ellen a vizsgált koncentrációkban, azaz a MIC értékük magasabb volt, mint a felhasznált törzsoldat koncentrációja. Kivételt képeznek a fenotiazin-származékok (CVO26:  $MIC_{\text{prometazin}}=31,25 \mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{\text{klórpromazin}}=16,13 \mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{\text{tioridazin}}=16,13 \mu\text{g/ml}$ ; *S. marcescens* AS-1:  $MIC_{\text{tioridazin}}=16,13 \mu\text{g/ml}$ ) és a bleomycin (CVO26:  $MIC_{\text{bleomycin}}=125 \mu\text{g/ml}$ ; *S. marcescens* AS-1:  $MIC_{\text{bleomycin}}=62,5 \mu\text{g/ml}$ ). Az akridin narancs legkisebb gátló koncentrációja nem került meghatározásra.

### Szűrés QS-gátló hatás irányába kereszt-kioltásos módszerrel

A kereszt-kioltásos módszerrel végzett szűrővizsgálatban a gyógyszervegyületek közül a prometazin, klórpromazin és a tioridazin (fenotiazin-származékok), a metamizol-nátrium, 5-fluorouracil, methotrexát, ciszplatin és a bleomycin rendelkezett QS-gátló hatással. Más vizsgált gyógyszervegyület vagy a kontrollvegyületek (kivétel: akridin narancs) esetén nem figyeltünk meg bakteriális sejt-kommunikációt befolyásoló hatást.

	Használt inokulum optikai denzitása (OD <sub>580</sub> )				
<b>24 h után</b>	0,1	0,3	0,5	0,7	1
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	-	-/+	+	+	++
<i>Chromobacterium violaceum</i> wt85	-	-/+	+	+	++*
<i>Sphingomonas</i> sp. Ezf 10-17	-/+	-/+	+	++	++
<i>Serratia marcescens</i> AS-1	++	++	+++	+++	+++
<i>Enterobacter cloacae</i> 31298	++	++	++	+++	+++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	-/+	-/+	+	++	++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	-/+	-/+	+	++	++
<b>48 h után</b>	0,1	0,3	0,5	0,7	1
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	++	+++	+++	+++	+++
<i>Chromobacterium violaceum</i> wt85	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*
<i>Sphingomonas</i> sp. Ezf 10-17	++	++	+++	+++	+++
<i>Serratia marcescens</i> AS-1	+++*	+++*	++++ *	++++ *	++++ *
<i>Enterobacter cloacae</i> 31298	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	+++	+++	+++	+++	+++
<b>72 h után</b>	0,1	0,3	0,5	0,7	1
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Chromobacterium violaceum</i> wt85	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*
<i>Sphingomonas</i> sp. Ezf 10-17	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Serratia marcescens</i> AS-1	+++	+++	++++	++++	++++
<i>Enterobacter cloacae</i> 31298	+++	+++	++++	++++	++++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	+++	+++	++++	++++	++++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	+++	+++	++++	++++	++++

(Jelmagyarázat: + – ++++: bakteriális növekedés/telepképzés szintje; \*: pigment képződés)

1. táblázat: A QS-törzsek növekedési tulajdonságai szobahőmérsékleten (25 °C)

### QS-gátlás vizsgálata korongdiffúziós (párhuzamos kioltásos) módszerrel

A gyógyszervegyületek közül a metamizol-nátrium, 5-fluorouracil, ciszplatin, methotrexát, bleomycin, prometazin, klórpromazin és tioridazin rendelkező koncentráció-függő QS-gátló hatással a vizsgált baktériumtörzseken. A CV026/*Enterobacter* modellpár esetén az 5-fluorouracil 50,0 mg/ml koncentrációban, míg a prometazin és a klórpromazin a pozitív kontrollal megegyező koncentrációban (25,0 mg/ml) fejtett ki erősebb QS-gátló hatást, mint az akridin narancs ( $14 \pm 1,2$  mm). Ezzel szemben a tioridazin 2,5-szer, a bleomycin 5-ször kisebb koncentrációban fejtett ki erősebb QS-gátló hatást (azaz megszűnt a CV026-ra jellemző, AHL-indukált violacein pigmentáció) (2. táblázat).

<i>C. violaceum</i> CV026/ <i>E. cloacae</i> 31298		
Gyógyszervegyület	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD (mm)
Metamizol-nátrium	1,0 mg/ml	$7 \pm 0,2$
	0,5 mg/ml	-
	0,25 mg/ml	
	0,125 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD (mm)
5-fluorouracil	50,0 mg/ml	$49 \pm 1,6$
	25,0 mg/ml	$12 \pm 0,8$
	12,5 mg/ml	-
	6,25 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD (mm)
Ciszplatin	10,0 mg/ml	$6 \pm 0,4$
	5,0 mg/ml	-
	2,5 mg/ml	
	1,25 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD (mm)
Methotrexát	10,0 mg/ml	$11 \pm 1,2$
	5,0 mg/ml	-
	2,5 mg/ml	
	1,25 mg/ml	

	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője ± SD (mm)
Bleomycin	5,0 mg/ml	27 ± 2,4
	2,5 mg/ml	13 ± 1,8
	1,25 mg/ml	3 ± 0,3
	0,625 mg/ml	-
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője ± SD (mm)
Prometazin	25,0 mg/ml	31 ± 4,6
	12,5 mg/ml	7 ± 2,0
	6,25 mg/ml	-
	3,13 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője ± SD (mm)
Klórpromazin	25,0 mg/ml	33 ± 1,5
	12,5 mg/ml	14 ± 0,6
	6,25 mg/ml	-
	3,13 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője ± SD (mm)
Tioridazin	10,0 mg/ml	38 ± 0,3
	5,0 mg/ml	13 ± 1,2
	2,5 mg/ml	6 ± 1,0
	1,25 mg/ml	-
Pozitív kontroll	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője ± SD (mm)
Akridin narancs	25,0 mg/ml	14 ± 1,2

2. táblázat: Gyógyszervegyületek QS-gátló hatása  
C. violaceum CV026/E. cloacae 31298 modellrendszerben

A *S. marcescens* esetében az 5-fluorouracil szintén a pozitív kontrollal meg-  
egyező koncentrációban fejtett ki erősebb bakteriális sejtkommunikáció-gátló  
hatást. A klórpromazin azonos koncentrációban a kontrollal közel azonos (19  
± 1,2 mm) hatással bírt, míg ciszplatin 2,5-szer kisebb koncentrációban (18 ±  
0,3 mm) megközelítette az akridin narancs hatását. A bleomycin 5-ször kisebb  
koncentrációban másfélszer erősebb QS-gátló hatást mutatott, a tioridazin



2,5-szer kisebb koncentrációban dupla olyan hatékony volt (19 vs. 40 mm) (3. táblázat).

	<i>S. marcescens</i> AS-1	
Gyógyszervegyület	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD (mm)
Metamizol-nátrium	1,0 mg/ml	11 $\pm$ 1,2
	0,5 mg/ml	-
	0,25 mg/ml	
	0,125 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
5-fluorouracil	50,0 mg/ml	52 $\pm$ 1,6
	25,0 mg/ml	37 $\pm$ 0,8
	12,5 mg/ml	14 $\pm$ 0,6
	6,25 mg/ml	4 $\pm$ 0,8
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Ciszplatin	10,0 mg/ml	18 $\pm$ 0,3
	5,0 mg/ml	8 $\pm$ 0,6
	2,5 mg/ml	-
	1,25 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Methotrexát	10,0 mg/ml	16 $\pm$ 1,7
	5,0 mg/ml	5 $\pm$ 0,3
	2,5 mg/ml	-
	1,25 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Bleomycin	5,0 mg/ml	33 $\pm$ 0,8
	2,5 mg/ml	17 $\pm$ 1,2
	1,25 mg/ml	-
	0,625 mg/ml	

	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Prometazin	25,0 mg/ml	$12 \pm 1,2$
	12,5 mg/ml	$3 \pm 1,2$
	6,25 mg/ml	-
	3,13 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Klórpromazin	25,0 mg/ml	$19 \pm 1,2$
	12,5 mg/ml	$12 \pm 1,6$
	6,25 mg/ml	-
	3,13 mg/ml	
	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Tioridazin	10,0 mg/ml	$40 \pm 0,9$
	5,0 mg/ml	$21 \pm 1,2$
	2,5 mg/ml	-
	1,25 mg/ml	
Pozitív kontroll	Koncentráció	Gátlási zóna átmérője $\pm$ SD
Akridin narancs	25,0 mg/ml	$19 \pm 0,8$

3. táblázat: Gyógyszervegyületek QS-gátló hatása  
*S. marcescens* AS-1 modellrendszerben

### Következtetések

Napjainkban több ezer gyógyszervegyület van forgalomban humán gyógyászati céllal, melyek akár forrásai lehetnek különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú QS-gátló anyagoknak. Mivel ezek a vegyületek farmakokinetikai paraméterei és tolerálhatósága már *in vivo* bizonyított, ezért az esetleges későbbi klinikai alkalmazásuk nagy mértékben megkönnyíthető lenne, hisz a pre-klinikai vizsgálatokban elvégzendő toxicitási vizsgálatokra már nem lenne szükség. Kísérleteink során számos, különböző hatástani csoportba tartozó gyógyszermolekula (neuroleptikumok, különböző molekuláris célpon-  
ton ható daganatellenes szerek, nem-szteroid gyulladásgátló) QS-gátló hatását

bizonyítottuk. Habár egyes molekulák esetében (pl. bleomycin) a megfigyelt gátló hatásban közre játszhat azok anitbakteriális hatása is, eredményeink rávilágítanak a jelenlegi gyógyszerkincsben rejlő kiaknázatlan potenciálra, mint QS-gátló (illetve tágabb értelemben virulencia gátló) vegyületek forrására, melyek ígéretesek lehetnek jövőbeni kísérletek tervezésére és további gyógyszermolekulák bevonására vizsgálatunkba.

## Összefoglalás

A multidrog rezisztens kórokozók által okozott fertőzések egyre növekvő száma és az új antibiotikumok hiánya súlyos problémát jelent az egészségügyben. A baktériumok képesek diffúzibilis szignálmolekulákkal (autoinducerekkel) kapcsolatot létesíteni a környező baktériumsejtekkel. Ezt a sejt-sejt kommunikációt quorum sensing-nek (QS) nevezzük, mely során a sejtpopuláció denzitásának függvényében megváltozik különböző bakteriális gének expressziója, amelyek fenotípusos változásokat idéznek elő (pl. antibiotikum rezisztencia, biofilm termelés, virulenciafaktorok, kompetencia). A QS-gátló vegyületek potenciális terápiás alternatívát jelentenek a humán gyógyászatban, azonban klinikai vizsgálatban még egy ilyen vegyület sem szerepelt. A kutatás célja a QS-gátlás vizsgálatára alkalmas korongdiffúziós módszer ideális kísérleti körülményeinek meghatározása (inkubáció ideje, hőmérséklet, felhasznált táptalaj), illetve a humán gyógyászatban alkalmazott vegyületek QS-gátló hatásának elemzése *in vitro*. A kutatás során harminc, különböző hatástani csoportba tartozó gyógyszervegyület (nem-szteroid gyulladáscsökkentők, daganatellenes szerek, antipszichotikumok, antivirális szerek, nyákoldók, vitaminok) QS-gátló hatását vizsgáltuk korongdiffúziós módszerrel. A hatékony vegyületek esetén a QS-gátló hatás koncentrációfüggését is meghatároztuk. A vizsgálatokhoz *Chromobacterium violaceum* wt85 (vad típusú, violacein pigment termelő) és CVo26 (Tn5 mutáns, AHL-indikátor), *Sphingomonas* sp. Ezf 10-17 (AHL-termelő), *Enterobacter cloacae* 31298 (AHL-termelő) és *Serratia marcescens* AS-1 (prodigiosin pigment termelő) baktériumtörzseket használtunk fel. A vegyületek antibakteriális hatását leveshígítási módszerrel vizsgáltuk a CLSI előírásai szerint. A kísérletek értékelése 48 órás, szobahőmérsékleten történő inkubáció után volt a legoptimálisabb, 2 g/l glükózzal és egy mikroelemeket tartalmazó törzsoldattal kiegészített Luria-Bertani (LB\*) agaron. A gyógyszervegyületek közül a metamizol-nátrium, 5-fluorouracil,

ciszpaltin, methotrexát, bleomycin, prometazin, klórpromazin és tioridazin rendelkezett koncentráció-függő QS-gátló hatással a vizsgált baktériumtörzseken. Napjainkban több ezer gyógyszervegyület van forgalomban humán gyógyászati céllal, melyek potenciális forrásai lehetnek különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú QS-gátló anyagoknak, mivel ezek a vegyületek farmakokinetikai paraméterei és tolerálhatósága már *in vivo* bizonyított. Kísérleteink során számos gyógyszermolekula QS-gátló hatását bizonyítottuk, melyek ígéretesek lehetnek további kísérletek tervezésére.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Spengler Gabriella egyetemi adjunktusnak,<sup>19</sup> hogy megismertette velem a Kemoterápia és profilaxis szakterületet, ezen belül szűkebb kutatási témámat, illetve, hogy a kísérletek elvégzését lehetővé tette, tanácsaival és támogatásával segítette kutatómunkámat. Szeretném megköszönni Dr. Burián Katalin egyetemi docensnek, hogy az általa vezetett Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetben végezhetem doktori (PhD) tanulmányaimat és lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzésére. Köszönettel tartozom Dr. Szegedi Ernőnek,<sup>20</sup> hogy rendelkezésemre bocsájtotta a vizsgálathoz szükséges baktérium törzseket. Köszönöm a Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Korányi Gyógyszertár munkatársainak a gyógyszervegyületek beszerzésében való aktív közreműködést. Külön köszönöm Vigykánné Váradí Anikó laborasszisztensnek, hogy lelkiismeretes munkájával megkönnyítette a kísérleti munkával töltött időt. A törzsek fenntartásában és kezelésében sok segítséget kaptam Kincses Annamáriától. Végezetül szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet munkatársainak segítségükért, támogatásukért. A kutatásunkat a Szegedi Rákkutatásért Alapítvány és a Balassi Intézet Kutatói Program (2017/18) támogatta.

---

19 Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 10., Magyarország.

20 Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4., Magyarország.

## Bibliográfia

- BOUCHER et al. 2009: BOUCHER, W. H. – TALBOT, H. G. – BRADLEY, S. J. – EDWARDS, E. J. – GILBERT, D. – RICE, B. L. – SCHELD, M. – SPELLBERG, B. – BARTLETT, J.: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48 (2009) 1–12.
- BUSH 2017: BUSH, K.: Synergistic Antibiotic Combinations. *Topics in Medicinal Chemistry* 1 (2017) 1–20.
- CHRISTENSEN et al. 2010: CHRISTENSEN, L. D. – VAN GENNIP, M. – JAKOBSEN, H. T. – GIVSKOV, M. – BJARNSHOLT, T.: Imaging N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in vivo. *Methods in Molecular Biology* 692 (2010) 147–157.
- DEFORIDT 2018: DEFORIDT T.: Quorum-Sensing Systems as Targets for Antiviral Therapy. *Trends in Microbiology* 26 (2018) 313–328.
- ECDC 2014: European Centre For Disease Control And Prevention 2014: Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012: 1–82. European Centre for Disease Prevention and Control (Stockholm, Svédország).
- EL-MOWAFY et al. 2014: EL-MOWAFY S. A. – ABD EL-GALIL Kh. – EL-MESSERY M. S. – SHAABAN I. M.: Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 74 (2014) 25–32.
- GARLAND et al. 2017: GARLAND, M. – LOSCHERT, S. – BOGYO, M.: Chemical Strategies To Target Bacterial Virulence. *Chemical Reviews* 117 (2017) 4422–4461.
- GONZÁLEZ-BELLO 2017: GONZÁLEZ-BELLO, C.: Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27 (2017) 4221–4228.
- JAKOBSEN et al. 2010: JAKOBSEN, H. T. – VAN GENNIP, M. – CHRISTENSEN, L. D. – GIVSKOV, M.: Qualitative and Quantitative Determination of Quorum Sensing Inhibition in vitro. *Methods in Molecular Biology* 692 (2010) 253–266.
- MAGIORAKOS et al. 2012: MAGIORAKOS, A. P. – SRINIVASAN, A. – CAREY, R. B. – CARMELLI, Y. – FALAGAS, M. E. – GISKE, C. G. – HARBARTH, S. – HINDLER, J. F. – OLSSON-LILJEQUIST, B. – PATERSON, D. L. – RICE, L. B. – STELLING, J. – STURELENS, M. J. – VATOPOULOS, A. – WEBER, J. T. – MONNET, D. L.: Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an

- international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 48 (2012) 268–281.
- MILLER – BASSLER 2001: MILLER, B. M. – BASSLER, L. B.: Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55 (2001) 165–199.
- RUTHERFORD – BASSLER 2012: RUTHERFORD T. S. – BASSLER L. B.: Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Springs Harbor Perspectives in Medicine* 2 (2012) a012427.
- SILVER 2011: SILVER, L.: Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews* 24 (2011) 71–109.
- SPENGLER et al. 2017: SPENGLER Gabriella – KINCSES Annamária – GAJDÁCS Mórió – AMARAL L.: New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* 22 (2017) Paper 468.
- SZABÓ et al. 2010: SZABÓ Ágnes Míra – VARGA Zoltán Gábor – HOHMANN Judit – SCHELZ Zsuzsanna – SZEGEDI Ernő – AMARAL L. – MOLNÁR József: Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research* 24 (2010) 782–786.
- SZABÓ et al. 2016: SZABÓ Andrea – GAJDÁCS Mórió – BALOGH Emese Petra – OSZLÁNCZI Gábor – PAPP András – PAULIK Edit: *Evaluation of public knowledge and attitudes towards antibiotic use in Hungary*. 18<sup>th</sup> Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of Abstracts. Újvidék 2016, 66.
- VARGA et al. 2011: VARGA Zoltán Gábor – SZABÓ Ágnes Míra – SCHELZ Zsuzsanna – SZEGEDI Ernő – AMARAL L. – MOLNÁR József: Quorum sensing inhibition by phenothiazines and related compounds. *Letters in Drug Design and Discovery* 8 (2011) 133–137.
- WORLD ECONOMIC FORUM 2013: WORLD ECONOMIC FORUM 2013: Global Risks Eight Edition: 28–62. *World Economic Forum* (Egyesült Államok).
- WHO 2014: WORLD HEALTH ORGANISATION 2014: *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*: 1–128. World Health Organisation (Genf, Svájc).
- WHO 2017: WORLD HEALTH ORGANISATION 2017: *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics*: 1–7. World Health Organisation (Genf, Svájc).
- WRIGHT 2016: WRIGHT D. G.: Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology* 24 (2016) 862–871.

